



Bescheinigung

Die Bayer Aktiengesellschaft in Leverkusen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Diffusionskontrollierende Sensorschicht"

am 3. April 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol G 01 N 21/76 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 28. Februar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 15 310.8

Wallner

Diffusionskontrollierende Sensorschicht

5 Aussagen zur biologischen Wirkung von Substanzen sind wesentlich für die Entwicklung und Anwendung von Wirkstoffen, insbesondere im pharmazeutischen Bereich. Wirkungsprüfungen stellen entscheidende Schritte bei der Bewertung der Ergebnisse der Kombinatorischen Chemie sowie der Evaluierung von Naturstoffen oder von synthetischen Substanzbibliotheken dar. Die Erfindung betrifft eine diffusionskontrollierende Sensorschicht, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur
10 Erfassung der biologischen Wirkung von Substanzen.

Zur Prüfung von biologischen Wirkungen werden im allgemeinen Mikrotiterplatten-Formate oder davon abgeleitete Formate angewendet. Gemeinsames Merkmal dieser Techniken ist die Durchführung des Wirkungsassays in abgeschlossenen
15 Kompartimenten (Mikrotiterplatten-Well, Vial, Sensorpunkt in Sensorarray). Dabei wird die zu prüfende Substanz in diskreten Flüssigkeitsvolumina, z.B. innerhalb der Mikrotiterplatten-Wells, mit dem Sensorsystem in Kontakt gebracht. Biologische Wirkung wird in den einzelnen Mikrotiterplatten-Wells über die jeweilige Reaktion des Sensorsystems, z.B. Farbänderung in Gegenwart bioaktiver Substanzen, erkannt
20 [High Throughput Screening, John P. Devlin, Marcel Dekker INC, New York, 1997]. Nach dem Stand der Technik befinden sich die Sensororganismen in einer Suspension, in der sie frei diffundieren können. In einer Suspension kann es zu einer Sedimentation der Sensororganismen während des Detektionsprozesses kommen. Außerdem wird keine gleichmäßige Beschichtung unterschiedlicher Materialien
25 (Glas, Kunststoff, Metall) und Oberflächen (glatt, rauh, porös) erreicht.

Die dem Stand der Technik entsprechenden Prüfverfahren ergeben zwar Wirkungsaussagen zu einer Probe als Ganzes, sie sind aber aufgrund ihrer diskontinuierlichen Arbeitsweise nicht in der Lage, die örtliche Verteilung von biologischer Aktivität auf
30 der Oberfläche von Untersuchungsobjekten abzubilden.

Eine weitere Einschränkung für Testverfahren nach dem Stand der Technik besteht in der Empfindlichkeit gegenüber Störungen, die zu falsch negativen Aussagen führen. So werden konventionelle Zell-basierte Tests durch cytotoxische Substanzen gestört, während enzymatische Tests z.B. durch denaturierende Substanzen beeinflusst werden. Diese störenden Komponenten können als Kontamination in der zu prüfenden Probe vorliegen oder sind Bestandteil des Substanzgemischs, wie es bei Naturstoffen oft der Fall ist.

Bei den etablierten Wirkungsprüfungen besteht das Problem, unter den Meßbedingungen die optimalen Konzentrationen oder Aktivitäten der zu prüfenden Substanzen einzustellen. Unter realen Testbedingungen sind die sich daraus ergebenden Forderungen für die Probenvorbereitungen von z. T. unbekannten Substanzen nur mit hohem Aufwand einzuhalten.

Wirkungstests, die auf einem mehrstufigen Prozess beruhen (z.B. auf Basis β -Galactosidase-Expression mit nachgeschalteter Farbreaktion), erfordern nach dem Stand der Technik eine mehrschrittige Arbeitsweise mit dem daraus folgenden erhöhten Aufwand für die Durchführung des Tests.

Geeignete Proben für Wirkungsprüfungen nach bekannten Verfahren sind Reinsubstanzen. In der Praxis liegen jedoch meistens Substanzgemische vor.

Hierzu wird in EP 588 319 beschrieben, wie die biologische Wirkung von Substanzen durch eine Kombination aus chromatographischer Auftrennung der zu testenden Substanzen in chromatographische Zonen mit einem anschließenden Test der biologischen Wirkung (der Toxizität) der einzelnen aufgetrennten Fraktionen, überprüft wird. Dazu werden die einzelnen Fraktionen in Kontakt mit Leuchtmikroorganismen gebracht, die durch eine lokale Änderung ihrer Biolumineszenz an den einzelnen Fraktionen die biologische Wirkung dieser Fraktion anzeigen.

Die Trennung der Substanzen in die Fraktionen erfolgt z.B. mittels Dünnschichtchromatographie (DC) oder Säulenchromatographie (HPLC). Im Falle der Dünnschichtchromatographie wird die DC-Platte mit einer Leuchtmikroorganismen-Suspension benetzt und die den einzelnen Fraktionen zugeordnete, lokale Biolumineszenz untersucht. Im Falle der Trennung mit Hilfe der Säulenchromatographie wird dem Eluat aus der chromatographischen Säule die Leuchtmikroorganismen-Suspension kontinuierlich zugemischt und die Biolumineszenz der Mischung gemessen.

10 In P. D. Shaw et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94, 1997, 6036-6041 ist eine dünnschichtchromatographische Methode beschrieben, bei der die Detektion von Homoserinlacton über ein Reportergensystem in einer 3 mm starken Agarschicht als Nährmedium erfolgt. Dieses Verfahren wird ausschließlich für den analytischen Nachweis des Homoserinlactons eingesetzt. Das für den Nachweis von Homoserinlacton beschriebene Detektionssystem beruht auf einem modifizierten Agrobacterium tumefaciens und Farbstoffbildung. Mit der hier beschriebenen hohen Schichtdicke können nur eine relativ geringe Abbildungsleistung und hohe Erfassungsgrenzen erreicht werden.

20 Die Aufgabe der Erfindung ist es, eine im Vergleich zum Stand der Technik einfachere, empfindlichere, schnellere, breiter einsetzbare und mit geringerem Artefakt-risiko behaftete Möglichkeit zur Erfassung der biologischen Wirkung von Substanzen zu finden.

25 Die Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe ist eine Sensorschicht zur Erfassung der biologischen Wirkung von Substanzen, die in Kontakt mit der Probe gebracht wird, bestehend aus einer diffusionskontrollierenden Matrix und darin suspendierten Sensoren.

30 Die Matrix kann dabei ein Nebenvaleanzgel, z.B. Agarose, ein Polymergel, z.B. Acrylat oder eine viskose Lösung, z.B. Polyethylenglykol in Wasser sein. Agar ist

wegen des relativ hohen Gelierpunktes insbesondere bei temperaturlabilen Sensoren wenig geeignet.

5 Als Sensorsysteme eignen sich grundsätzlich alle für Wirkungsprüfungen geeigneten Sensoren, die in Sensorschichten inkorporiert werden können. Geeignete Sensoren sind z.B. Mikroorganismen, insbesondere Zellen mit Reporter-genkonstrukten, Enzymsysteme, Antikörper und Fluoreszenzsensoren.

10 Die Sensorschicht bildet eine Diffusionsbarriere für die mit ihr in Kontakt befindlichen Substanzen. Verschiedene Stoffe diffundieren unterschiedlich schnell und unterschiedlich weit in die Sensorschicht hinein, da der Massentransport in der Sensormatrix substanzspezifisch unter anderem abhängig von Polarität und Molekülgröße verläuft. Dadurch bildet sich innerhalb der Sensorschicht ein Konzentrationsgradient für die einzelnen zu prüfenden Fraktionen oder Substanzen aus. Für
15 jedes Detektionsprinzip mit dem zugehörigen Sensor ist in einem bestimmten Abstand vom Träger eine optimale Konzentration der zu prüfenden Substanz oder Fraktion vorhanden. Innerhalb des Profils kann auch die konzentrationsabhängige Wirkung beobachtet werden. Außerdem werden störende Substanzen wie Verunreinigungen durch den Diffusionsprozess räumlich innerhalb der Sensorschicht von wirksamen Substanzen abgetrennt.

20 Darüber hinaus können in die Sensorschicht Zusätze eingebracht werden, die den Detektionsprozeß direkt kontrollieren, indem sie die Nachweisempfindlichkeit, die Selektivität und die Kinetik der Sensorschicht beeinflussen. Ein solcher Zusatz ist
25 z.B. ein Puffer zur Regulierung des Vitalitätsstatus von Sensorzellen.

Die diffusionskontrollierende Sensorschicht kann auch Indikatorsubstanzen (z.B. pH-Indikatoren, Redoxfarbstoffe) aufnehmen, die ortsauflösende Aussagen zu pH-Werten oder Redoxeigenschaften auf Oberflächen von Untersuchungsobjekten ermöglichen.
30

Der Zusatz von Biolumineszenzsubstraten, Chemolumineszenzreagenzien, Fluoreszenzreagenzien und anderer Komponenten, die in bestimmten Prüfverfahren eine Rolle spielen, in die Sensorschicht erlaubt es, mehrstufige Detektionsprozesse in der Sensorschicht in einem Arbeitsschritt auszuführen. Eine solche mehrstufige Reaktion ist z.B. die β -Galactosidase Expression mit anschließender Farbstoffbildung oder Fluoreszenz- oder Chemolumineszenz-Reaktion.

Die Schichtdicke der Sensorschicht beträgt bevorzugt 0,1 bis 10 mm, besonders bevorzugt 0,5 bis 3 mm, ganz besonders bevorzugt 0,5 bis 0,8 mm.

Die Sensorschicht enthält in einer bevorzugten Ausführungsform in 50 ml Sensorschichtmasse 2 bis 8 ml Reportergerenzellsuspension, besonders bevorzugt 3 bis 5 ml Reportergerenzellsuspension.

Die eingesetzte Reportergerenzellsuspension hat bevorzugt eine optische Dichte von 0,6 bis 1,4 bei 660 nm Wellenlänge.

Die Sensorschicht selbst kann aus mehreren Schichten aufgebaut sein. Dabei dienen die einzelnen Schichten verschiedenen Zwecken und können entsprechend ihrem Zweck unterschiedlich dick sein. Die einzelnen Schichten können folgende Funktion haben:

- Aufnahme unterschiedlicher Sensorsysteme für multiple Detektion
- Aufnahme von Zusätzen zur Steuerung und Unterstützung des Detektionsprozesses
- Wirkung als Diffusionsbarriere oder Substanz-selektive Filterschicht.

Es können auch mehrere, verschiedene Sensoren mit unterschiedlicher Wirkungsspezifität in die Matrix suspendiert werden, um so verschiedene biologische Wirkungen simultan zu erfassen. Es ergibt sich so eine Multisensorschicht. Um zu unterscheiden welcher Sensor in einer solchen Multisensorschicht eine biologische Wirkung zeigt, müssen die von den einzelnen Senoren ausgesandten Signale

unterschiedlich sein. Beispiele hierfür sind eine Multisensorschicht mit mehreren Reporterzelllinien, die unterschiedliche biologische Aktivitäten mit unterschiedlichen Signalen wie z.B. Biolumineszenz, GFP-Fluoreszenz, β -Galactosidase-Expression anzeigen. Statt mehrerer verschiedener Sensoren können auch Reporterzelllinien, die mehrere unterschiedliche Wirkungen simultan anzeigen, verwendet werden. Die Signale der Multisensorschicht lassen sich parallel auswerten.

Die Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe ist außerdem ein Verfahren zur Prüfung der biologischen Wirksamkeit von Substanzen. Die Probe wird zunächst auf oder in die Oberfläche eines Trägers gebracht, sofern sie nicht bereits Bestandteil eines Trägers ist. Als Träger kann entweder die Sensorschicht selber dienen oder ein zusätzlicher Träger. Sofern die Sensorschicht nicht selbst als Träger dient, wird der Träger dann mit der erfindungsgemäßen Sensorschicht belegt. Anschließend wird die Wirkung der Substanz auf die Sensoren in der Sensorschicht bestimmt.

Als Träger können außer der Sensorschicht selber glatte, strukturierte oder poröse Objekte aus Glas, Kunststoffen, Metall oder aus anderen organischen oder anorganischen Materialien und Werkstoffen dienen. Insbesondere sind Papier, Membranen, Filme, Folien oder Polymerperlen geeignet. Es kann auch direkt biologisches Material wie Gewebeschnitte oder Pflanzenblätter als Probe dienen, so daß hier die Probe gleich Bestandteil des Trägers ist.

Die zu testende Substanz auf dem Träger kann ungetrennt oder beispielsweise durch Dünnschichtchromatographie oder Säulenchromatographie in Fraktionen aufgetrennt, vorliegen.

Die Sensorschicht kann auf den Träger aufgetragen werden durch Gießen, Tauchen, Walzen, Sprühen oder als Film.

Wenn die Sensorschicht selbst als Träger dient, wird die zu testende Substanz direkt auf die Sensorschicht aufgebracht z.B. durch Mikrodosiersysteme oder druck-

technische Verfahren, bei denen Substanzen auf die Schicht übertragen werden. Ein drucktechnisches Verfahren besteht beispielsweise darin die Nadeln eines Stempels in die zu testenden Substanzen zu tauchen, die sich beispielsweise in den Wells einer Mikrotiterplatte befinden. Dabei benetzt jede Einzelsubstanz eine Nadelspitze. Der
5 Stempel mit den Nadeln wird dann in die Sensorschicht gepreßt. Alternativ können auch die Probensubstanzen auf Papier aufgetragen werden und dieses Papier mit der durch die Probensubstanzen beschichteten Seite auf die Sensorschicht gedrückt werden.

- 10 Bei Verwendung einer Sensorschicht, die Zellen als Sensoren enthält, erfolgt vor der Bestimmung der Wirkung der in der Probe enthaltenen Substanzen auf die Sensoren ein Inkubationsschritt. Hierzu wird die Sensorschicht oder der mit der Sensorschicht belegte Träger entsprechend den Anforderungen der eingesetzten Zellen unter definierten Bedingungen bezüglich Temperatur, Feuchtigkeit und Begasung eine vorgegebene Zeit gelagert. Danach wird erst die Wirkung der zu testenden Substanz auf
15 die Sensoren bestimmt.

- Das erfindungsgemäße Verfahren gestattet es, Anreicherungsverfahren direkt mit dem Wirkungstest zu verbinden. Anreicherungen sind z.B. nötig, wenn es sich um
20 schwach wirksame Substanzen handelt. Die Inhaltsstoffe einer Probenlösung können durch unspezifische oder durch spezifische Adsorption an geeigneten Trägern wie Membranen, Ionenaustauschmatrices, Affinitätsmatrices, Dünnschichtchromatographieplatten oder Papier angereichert werden. Das Anreichern kann durch direkten Kontakt des Trägers mit einem hinreichend großen Volumen der Probelösung erreicht werden. Hierzu können auch spezielle Probenaufgabetechniken der Chromatographie mit anreichernder Wirkung, z.B. Konzentrierungsschichten aus der Dünnschichtchromatographie oder steile Lösemittelgradienten eingesetzt werden. Die auf der Trägermatrix angereicherten und immobilisierten Substanzen können nach Belegen mit der aktiven Sensorschicht direkt auf ihre biologische Wirkung geprüft
25 werden.
30

Die Wirkung der Substanzen der Probe auf die Sensoren in der Sensorschicht wird bevorzugt mit Hilfe bildgebender Verfahren wie photographische Verfahren, Video Imaging oder auch als Handzeichnung festgehalten. Typische Reaktionen eines Sensors auf eine Substanz sind z.B. die Induktion oder die Löschung der Lichtemission aus Biolumineszenz- oder Chemolumineszenzprozessen, die Induktion oder die Löschung von Fluoreszenzemissionen sowie die integrale oder spektrale Änderung der Lichtabsorption. Die biologische Aktivität wird für die Positionen auf dem Träger, an denen sich eine bestimmte Substanz befindet, aufgrund des jeweiligen Sensormechanismus angezeigt.

10

Eine Reihe von Nachweisprinzipien - z.B. Biolumineszenz, Fluoreszenz, Farbstoffbildung - gestatten die mehrfache Beobachtung der detektierten Wirkung zu verschiedenen Zeitpunkten, so daß auch detaillierte kinetische Resultate zum Verlauf der Wirkung erhalten werden. Bevorzugt werden Nachweisverfahren über die Messung von Lichtemission gegenüber Messungen der spektralen Änderung der Lichtabsorption, da hier deutlich höhere Empfindlichkeiten zu erreichen sind und bei der Messung von Lichtemission nach wesentlich kürzerer Zeit Signale nachweisbar sind.

15

20

Die Auswertung der Bilddaten kann qualitativ im Sinne einer Ja/Nein-Aussage zur biologischen Aktivität und quantitativ zur Bewertung von Wirkungshöhen und der räumlichen Verteilung der Aktivität erfolgen. Hierzu können Bildverarbeitungsprogramme oder auch visuell vergleichende Verfahren eingesetzt werden, die jeweils mit bekannten Referenzwirkungen kalibriert werden.

25

Die Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe besteht weiterhin in einer Vorrichtung bestehend aus einer erfindungsgemäßen Sensorschicht die in Kontakt mit der zu untersuchenden Substanz steht und einem bildgebenden System in dessen Detektionsbereich sich ein Teil oder die gesamte Sensorschicht befindet.

30

Bevorzugt zeigen die Sensoren der Sensorschicht ihre Aktivität durch Emission oder Löschung von Lichtemission an, die dann durch ein entsprechendes bildgebendes System detektiert wird.

5 Die erfindungsgemäße Sensorschicht, das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung bieten gegenüber dem Stand der Technik eine Reihe von Vorteilen, insbesondere für Zell-basierte Wirkungsprüfungen:

10 1. Die Sensorschicht steuert sowohl durch Diffusionskontrolle wie auch über regulierende und unterstützende Zusätze den Detektionsprozess. Darüber hinaus erlaubt der Aufbau der Sensorschicht die gleichmäßige Beschichtung unterschiedlicher Materialien (Glas, Kunststoff, Metall) und Oberflächen (glatt, rauh, porös). Weiterhin wird die Sedimentation der Sensororganismen während des Detektionsprozesses vermieden.

15 2. Bei Untersuchungen bioaktiver Substanzen besteht häufig die Gefahr, daß der Test gestört wird, wenn die Konzentration der zu testenden Substanz zu hoch ist. Dieses Artefaktrisiko ist durch den großen erfaßten Konzentrationsbereich in der diffusionskontrollierenden Sensorschicht deutlich verringert. Der Konzentrationsgradient einer Substanz in der Sensorschicht erlaubt Zonen biologischer Aktivität unterhalb cytotoxischer Konzentrationen von Substanzen. Dies ist vorteilhaft für Wirkungstests von Substanzen mit unbekannten Prüfkonzentrationen. Der Aufwand für die Bestimmung und Standardisierung der Substanzkonzentrationen kann reduziert werden oder entfallen.

25 3. Substanzgemische, die cytotoxische oder andere, mit Wirkungstests interferierende Komponenten enthalten, können im Vergleich zu konventionellen Techniken mit geringerem Risiko falsch negativer Ergebnisse auf biologische Aktivität geprüft werden. Die diffusionskontrollierende Sensorschicht erzeugt
30 für unterschiedliche Substanzen unterschiedliche Konzentrationsprofile und

trennt so die störenden von den zu testenden Bestandteilen des Substanzgemischs.

- 5 4. Wenn sich auf einem Träger verschiedene Substanzen räumlich getrennt befinden, z.B. in chromatographischen Zonen, so besteht in der konventionellen Technik die Gefahr, daß sich, insbesondere bei langen Inkubationszeiten die Substanzen auf verschiedenen Positionen des Trägers vermischen. Die diffusionskontrollierende Sensorschicht verhindert eine zu starke Diffusion selbst bei langen Inkubationszeiten, so daß die Zonen wirksamer
10 Substanzen auf Trägern auch nach langen Inkubationszeiten über ihre Wirkung erkannt werden können.
- 15 5. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt eine orts aufgelöste Erfassung von lokal variierenden Wirkstoffmengen, z.B. in Pflanzenteilen oder tierischen Geweben. Es erlaubt hohe räumliche Auflösungen.
6. Beim Einsatz einer Multisensorschicht lassen sich in kurzer Zeit Wirkungen von Substanzen auf eine Vielzahl von Sensoren untersuchen. Es können leicht
20 Wirkungsprofile von Wirkstoffen aufgestellt werden.

20

Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Untersuchung von biologischen Wirkungen und der Aufstellung von Wirkstoffprofilen in „Drug-Discovery-Programmen“ und für mechanistische Untersuchungen der Wirkungsverteilung und der Wirkungsfreisetzung z.B. in pflanzlichen oder tierischen Geweben verwendet
25 werden.

Figuren und Beispiele

Die Figuren zeigen:

5 Fig. 1 Schematischer Aufbau einer erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Fig. 2 Ergebnis einer Bioaktivitätsmessung mit der erfindungsgemäßen Sensorschicht.

10 Fig. 3 Vergleich zwischen konventionellem und erfindungsgemäßem Verfahren bei der Messung an einem Substanzgemisch mit toxischen Bestandteilen.

Fig. 1 zeigt schematisch eine erfindungsgemäße Vorrichtung. Auf dem Träger (1) befindet sich als Probe eine adsorbierte Substanz (2). Auf dem Träger (1) mit der Substanz (2) liegt die diffusionskontrollierende Sensorschicht (3). Oberhalb der Sensorschicht (3) befindet sich ein bildgebendes System (4), das das optische Signal (5) detektiert. Die auf dem Träger (1) befindliche Substanz (2) diffundiert (6) in die Sensorschicht (3) und löst an den Sensoren (7) das optische Signal (5) aus.

20 Beispiel 1

Beispiel 1 zeigt eine Abbildung biologisch aktiver Strukturen auf einem festen Träger mit der erfindungsgemäßen Sensorschicht.

25 Um die Abbildungsleistung einer Sensorschicht zu untersuchen, wurde die wirkungsaktive Substanz Ciprofloxacin mittels eines Inkjet-Printers (HP DeskJet 870 Cxi) in Form einer Testgrafik auf einen Träger aufgebracht (Fig. 2, rechte Seite). Als Träger diente eine mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolie von Merck (Art. Nr. 1.05553). Zur Wirkungsdetektion enthielt die Sensorschicht gentechnisch hergestellte Reportergenzellen, die die biologische Aktivität des Ciprofloxacins durch
30 Biolumineszenz wirkungsspezifisch anzeigen. Die durch den Ciprofloxacin-Auftrag

festgelegte örtliche Wirkungsverteilung auf dem Papierträger wurde über die in der Sensorschicht induzierte Biolumineszenz mit einem Video-Imaging-System registriert.

5 Das Ergebnis ist in Fig. 2, linke Seite dargestellt und zeigt für den gesamten Biolumineszenz-Imagingprozess eine grafische Auflösung von ca. 20 lpi (lines per inch). Dies reicht aus, um z.B. Wirkungsprüfungen als Tüpfeltests mit einer Spotdichte von mehr als 25 Spots/cm² auszuführen.

10 Detailangaben und die experimentellen Bedingungen zu Beispiel 1 sind nachfolgend angegeben:

1. Reportergenzellen

15 Die Reportergenzelle besteht aus dem Escherichia coli Stamm SM101, der das rekombinante Plasmid pEBZ181 trägt. Dieses Plasmid kodiert eine Fusion zwischen dem recA-Promotor aus E. coli und den Strukturgenen des bakteriellen Leuchtens aus Vibrio fischeri (lux-Gene C, D, A, B, E und G). Zur Konstruktion des Plasmides wurde das recA-Promotor-tragende Bam H I-Fragment aus dem Plasmid pUA80
20 [Barbe J, Fernandez de Henestrosa AR, Calero S, and Gibert I (1991) Chromogenic Method for rapid isolation of recA-like mutants of Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 173: 404-406] in ein Derivat des Vektors pEBZ112 [Peitzsch N, Eberz G, and Nies D (1998) Alcaligenes eutrophus as a bacterial chromate sensor. Appl. Environm. Microbiol. 64: 453-458], das inseriert in der Nco I Stelle des luxG-Gens
25 eine lacZ-Kassette [Becker A (1993) Analyse der Succinoglycan-Biosyntheseregion von Rhizobium meliloti 2011: Untersuchungen zur Identifizierung des bakteriellen Infektionssignals in der Symbiose mit Luzerne. Doktorarbeit, Universität Bielefeld, Deutschland] trägt, kloniert. Plasmid pEBZ181 wurde über Standardmethoden [Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory
30 manual (2nd edn), Cold Spring Harbor Laboratory Press] in den Escherichia coli

Stamm SM101 (erhalten vom E. coli Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, USA) transformiert und für Bioimaging-Versuche eingesetzt.

Die Behandlung von Bakterien mit antibakteriellen Agenzien wie 4-Chinolon-carbonsäuren führt zur Induktion des sogenannten SOS-Reparaturmechanismus [Walker CG (1984) Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 48: 60-93; Phillips I, Culabras E, Moreno F, and Baquero F (1987) Induction of the SOS response by new 4-quinolones. J. Antimicrob. Chemother. 20: 631-638; Piddock LJ, and Wise R (1987) Induction of the SOS response in *Escherichia coli* by 4-quinone antimicrobial agents. FEMS Microbiol. Lett. 41: 289-294]. Das RecA-Protein ist ein Hauptregulator dieses Reparaturmechanismus, wobei die SOS-Induktion zu einer verstärkten Expression des recA-Gens führt. Die Messung der Synthese des RecA-Proteins [Little JW and Mount DW (1982) The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. Cell 29: 11-22; Witkin EM (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. Bacteriol. Rev. 40: 864-907] oder von recA-Reportergenfusionen [Nunoshita T and Nishioka H (1991) Rec-lac test for detecting SOS-inducing activity of environmental genotoxic substances. Mutation Res. 254:71-77] ist eine Möglichkeit die SOS-Induktion und folglich die Wirkung von 4-Chinoloncarbonsäuren zu messen. Da der Stamm E. coli SM101 (pEBZ181) ein Plasmid mit einer recA-lux Reportergenfusion trägt, eignet er sich zum Nachweis von 4-Chinolon-carbonsäuren oder anderen SOS-induzierenden Verbindungen. Die Gegenwart solcher Verbindungen führt zu einer verstärkten Expression der Luciferasegene und damit zur einer Stimulierung der Biolumineszenz.

2. Sensorschichtmasse

Die Beschichtungsmasse setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 30 - 32 ml 1 % Agarose (Agarose MP Boehringer Mannheim GmbH Art. Nr. 1388983); diese niedrig schmelzende Agarose erlaubt es, temperaturempfind-

liche Reporterzellen bei Temperaturen unter 40°C ohne Schädigung zu suspendieren.

- 5 - 4 ml LB Medium 200 g/l (GIBCO BRL Art. Nr. 12780-052); der Zusatz von LB-Medium dient zur Aufrechterhaltung der vitalen Funktionen der Reporterzellen während der Inkubationszeit.
- 10 - 4 ml Bakteriensuspension in LB-Medium 20 g/l; damit ergab sich eine optische Dichte von 1,2 bei 660 nm Wellenlänge; über das Volumen der zugesetzten Bakteriensuspension wird die Zelldichte, d. h. die Dichte der Sensoren in der Sensorschicht gesteuert, um das Signal-Rausch-Verhältnis und die Ortsauflösung zu optimieren.
- 15 - 10 ml Wasser; dieser Zusatz regelt die Viskosität der Gießmasse und die mechanische Stabilität der Sensorschicht nach dem Aushärten.

3. Testgrafik

20 Die Testgrafik wurde mit Corel Draw (Version 8) erstellt. Die Linienstärke beträgt für die Linienraster 0,1 mm. Die Dot-Matrix enthält in 1/2 Inch² 50 quadratische Dots (Kantenlänge 1 mm). Die Dots wurden mit einer Farbsättigung von 50 % gedruckt, alle übrigen Elemente der Testgrafik wurden mit 100 % Farbsättigung gedruckt.

25 4. Ciprofloxacin-Auftrag auf Kieselgel-beschichtete Aluminiumfolie

30 42 ml einer Lösung von 120 mg Ciprofloxacinhydrochlorid-Monohydrat in Wasser wurden in eine vorher entleerte Tintenpatrone des Inkjet-Printers HP DeskJet 870 Cxi gegeben. Die unter 3. beschriebene Testgrafik (Fig. 2, rechte Seite) wurde mit dem Inkjet Printer auf die Kieselgel-Schicht der Aluminiumfolie gedruckt.

5. Auftrag der Sensorschicht und Inkubation

Die Aluminiumfolie wurde unter einem Stickstoffstrom getrocknet, in einen passenden Edelstahlrahmen mit erhöhtem Rand eingesetzt, auf einem Nivelliertisch
5 waagrecht positioniert und mit der unter 2. erhaltenen Sensorschichtmasse gleichmäßig begossen, so daß eine Schichtdicke von 2 mm erreicht wurde. Nach Aushärten der Sensorschicht bei Raumtemperatur wurde der beschichtete Träger bei 28 °C für 60 Minuten inkubiert.

10 6. Videoimaging

Der nach 5. inkubierte Träger wurde mit einem Videoimaging-System („Molecular Light Imager NightOWL“ von EG&G Berthold) gemäß Bedienungsanleitung vermessen. Die Aufnahmezeit betrug 60 s, die Kameraposition wurde auf ein
15 Bildformat von 10 x 20 cm optimiert. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die erhaltenen Image-Daten in TIFF-Files konvertiert und anschließend mit geeigneten Grafikprogrammen (Corel Draw Version 8, Corel Photo Paint Version 8 oder Photoshop Version 4.0) formatiert, beschriftet und über einen Laserprinter (HP LaserJet 5) ausgegeben. In Fig. 2 wird das Biolumineszenz-Image, das die Wirkung
20 des auf die Kieselgel/Aluminiumfolie gedruckten Ciprofloxacin abbildet, zusammen mit der Original-Testgrafik gezeigt.

Beispiel 2

25 Beispiel 2 zeigt eine Anwendung der Sensorschicht für Aktivitätstests in Gegenwart cytotoxischer Substanzen und einen Vergleich mit einem analogen Mikrotiterplattentest.

Im Gegensatz zu üblichen Mikrotiterplatten-Formaten kann die diffusionskontrollierende Sensorschicht für Tests von Substanzgemischen, die störende Komponenten enthalten, eingesetzt werden, denn die Störkomponenten werden durch
30

Diffusions- und Adsorptionsprozesse in situ abgetrennt, so daß das Risiko für falsch negative Resultate herabgesetzt wird. Am Beispiel von Bioaktivitätstests mit dem SOS-Reportergensystem (siehe Beispiel 1) kann die Überlegenheit der Sensorschicht im Vergleich zu Mikrotiterplattenformaten belegt werden.

5

In beiden Testformaten diente Ciprofloxacin zur wirkungsspezifischen Induktion der SOS-Antwort. Die in dem hier verwendeten Reportergensystem stimulierte Biolumineszenz lieferte das Read-Out-Signal, das durch Videoimaging erfaßt wurde. Um die Toleranz der beiden Bioassayformate gegenüber störenden Substanzen zu prüfen, wurden Tests in Gegenwart von cytotoxischem Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) ausgeführt. Dabei zeigte sich, daß für das Sensorschicht-Format die relative Biolumineszenz als Maß der selektiven Stimulation durch Ciprofloxacin bis zu CTAB-Konzentrationen von 500 ng/200 µl konstant blieb, während das Mikrotiterplattenformat in diesem Bereich bereits eine Biolumineszenzminderung von über 50 % aufwies (Fig. 3).

10

15

Detailangaben und die experimentellen Bedingungen zu Beispiel 2 sind nachfolgend aufgeführt:

20

1. SOS-Reportergensystem

Es wurde das gleiche SOS-Reportergensystem verwendet wie in Beispiel 1.

25

2. Mikrotiterplatten-Tests

Fünf Testlösungen wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Dynatech Microlite) angesetzt. In jeweils 200 µl Volumen waren enthalten:

94 µl 2 % LB Medium (GIBCO BRL Art. Nr. 12780-052)

16 µl Reportergenzellsuspension (OD:1,2 bei 660 nm) in 2 % LB Medium

30

90 µl Lösung der Substanzen 1. - 5. In Wasser

1. 25 ng Ciprofloxacinhydrochlorid-Monohydrat
2. 25 ng Ciprofloxacinhydrochlorid-Monohydrat + 50 ng CTAB
3. 25 ng Ciprofloxacinhydrochlorid-Monohydrat + 100 ng CTAB
4. 25 ng Ciprofloxacinhydrochlorid-Monohydrat + 200 ng CTAB
5. 25 ng Ciprofloxacinhydrochlorid-Monohydrat + 500 ng CTAB

Die Mikrotiterplatte wurde 60 min bei 28°C inkubiert und darauf mit dem Video-imagingsystem „Molecular Light Imager NightOWL“, von EG&G Berthold ver-

10 messen. Für die einzelnen Wells wurden jeweils die mittleren Grauwerte bestimmt. Die relative Biolumineszenz wurde durch Division dieser Grauwerte durch den Wert für die CTAB-freien Referenzlösung ermittelt. Für zwei Meßreihen wurden die Mittelwerte der relativen Biolumineszenzintensität in Abhängigkeit von der CTAB-Konzentration bestimmt:

CTAB [ng/200µl]	rel. Biolumineszenz
0	1,00
50	0,88
100	0,87
200	0,78
500	0,44

15 Zum Vergleich sind die Ergebnisse in der untenstehenden Abbildung den Resultaten für das Sensorschichtformat gegenübergestellt.

3. Aktivitätsmessungen mit der Sensorschicht

20

Zur Erfassung der Ciprofloxacinwirkung mit der Sensorschicht wurden auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (Merck Art. Nr. 1.15445 Si 60 F_{254s}) mittels Einmalmikropipetten die folgenden Testlösungen aufgegeben:

1. 1 µl wässrige Lösung von 10 ng Ciprofloxacinhydrochlorid-Monohydrat
 2. 1 µl wässrige Lösung von 10 ng Ciprofloxacinhydrochlorid-Monohydrat + 50 ng CTAB
 3. 1 µl wässrige Lösung von 10 ng Ciprofloxacinhydrochlorid-Monohydrat + 100 ng CTAB
- 5

Die unter einem Stickstoffstrom getrockneten DC-Platten wurden mit einer Suspension der lumineszenten Sensorbakterien (siehe Beispiel 1) in 0,6 % Agarose mit einer Schichtdicke von ca. 2 mm auf einem Nivelliertisch planar beschichtet. Danach wurden die DC-Platten für 60 min bei 28°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der induzierten Biolumineszenz durch Imaging mit dem hochauflösenden CCD Low Light Imaging System „Molecular Light Imager NightOWL“, von EG&G Berthold. Imaging-Bedingungen: Aufnahmezeit 60 s; Kameraposition auf DC-Plattenformat von 10 x 20 cm optimiert. Für die lumineszierenden Spots wurden die mittleren Grauwerte bestimmt. Um den Vergleich mit den oben beschriebenen Resultaten für das Mikrotiterplattenformat zu führen, wurden aus den auf die Dünnschichtplatte aufgegebenen Substanzmengen die analogen Konzentrationen ermittelt. Für diese Abschätzung wurde eine Diffusion der Substanzen im Sensorschichtvolumen oberhalb der Substanzspots (Spotdurchmesser 5 mm, Schichtdicke 2 mm) angenommen. Zwei Meßreihen lieferten die folgenden relativen Biolumineszenzintensitäten (Mittelwerte) in Abhängigkeit von der CTAB-Konzentration:

10

15

20

CTAB [ng/200µl]	rel. Biolumineszenz
0	1,000
250	1,002
500	1,023

4. Vergleich der Ergebnisse

5 Der Vergleich der Messungen mit beiden Formaten zeigt, daß im Fall der Sensorschicht die Bioaktivitätsmessung durch den CTAB-Zusatz nicht beeinträchtigt wurde, während beim Mikrotiterplattenformat ein deutlicher Abfall (ca. 40 % des Ausgangswerts) der Biolumineszenz auftrat. Diese Resultate sind in Fig. 3 grafisch gegenübergestellt.

Patentansprüche

1. Sensorschicht zur Erfassung der biologischen Wirkung von Substanzen dadurch gekennzeichnet, daß die Sensorschicht aus einer diffusionskontrollierenden Matrix und darin suspendierten Sensoren besteht.
5
2. Sensorschicht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix ein Gel wie Agarose, Polyacrylate oder eine viskose Lösung ist.
3. Sensorschicht nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Sensoren prokaryotische oder eukaryotische Zellen, subzelluläre Partikel, Enzymsysteme, Antikörper, Fluoreszenzsensoren oder Indikatorfarbstoffe sind.
10
4. Sensorschicht nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere verschiedene Arten von Sensoren oder eine Art von Sensoren, die verschiedene biologische Wirkungen anzeigen kann, in der Sensorschicht suspendiert sind.
15
5. Sensorschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Sensorschicht Zusätze enthält, die den Detektionsprozeß kontrollieren oder unterstützen.
20
6. Sensorschicht nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusätze Puffer für die Regulierung des Vitalitätsstatus von Sensorzellen sind.
25
7. Sensorschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Sensorschicht Biolumineszenzsubstrate, Chemolumineszenzreagenzien oder Fluoreszenzreagenzien enthält.
8. Sensorschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Sensorschicht aus mehreren Teilschichten besteht, wobei die Teil-
30

schichten unterschiedlich dick sein können und sich durch Art und Menge von Sensoren und/oder Zusätzen unterscheiden.

- 5
9. Sensorschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß in 50 ml Sensorschichtmasse bevorzugt 2 bis 8 ml, besonders bevorzugt 3 bis 5 ml Reportergenzellsuspension enthalten sind.
- 10
10. Sensorschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Reportergenzellsuspension eine optische Dichte von 0,6 bis 1,4 bei 660 nm hat.
- 15
11. Sensorschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 10 dadurch gekennzeichnet, daß die Dicke der Schicht 0,1 bis 10 mm, vorzugsweise 0,5 bis 3 mm, besonders bevorzugt 0,5 bis 0,8 mm beträgt.
- 25
12. Verfahren zur Erfassung der biologischen Wirkung von Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß
- a.) die zu testende Probe auf oder in die Oberfläche eines Trägers gebracht wird, oder bereits Bestandteil einer zu testenden Oberfläche ist,
- b.) der Träger mit einer Sensorschicht aus einem der Ansprüche 1 bis 11 belegt wird, sofern die Sensorschicht nicht selbst als Träger dient,
- 30
- c.) die Wirkung der in der Probe enthaltenen Substanz oder Substanzen auf die Sensoren in der Sensorschicht bestimmt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Sensorschicht selber als Träger verwendet wird.

- 5 14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß bei Verwendung einer Sensorschicht, die Zellen als Sensoren enthält, vor der Bestimmung der Wirkung der in der Probe enthaltenen Substanzen auf die Sensoren ein Inkubationsschritt eingelegt wird, indem die Sensorschicht oder der mit der Sensorschicht belegte Träger entsprechend den Anforderungen der eingesetzten Zelllinien unter definierten Bedingungen bezüglich Temperatur, Feuchtigkeit und Begasung eine vorgegebene Zeit gelagert wird.
- 10 15. Verfahren nach Ansprüchen 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirkung der Substanz auf die Sensoren in einer ortsabhängigen Induktion oder Löschung der Lichtemission aus Biolumineszenz- oder Chemolumineszenzprozessen, der Induktion oder der Löschung von Fluoreszenzemissionen sowie einer integralen oder spektralen Änderung der Lichtabsorption besteht.
- 15 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die zu testende Probe ein Substanzgemisch ist, das chromatographisch in Fraktionen getrennt wird, bevor es in Kontakt mit der Sensorschicht gebracht wird.
- 25 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die chromatographische Trennung in Fraktionen in einer Chromatographiesäule stattfindet und das Eluat fortlaufend auf verschiedene Stellen des Trägers aufgebracht wird.
- 30 18. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die chromatographische Trennung in Fraktionen durch Dünnschichtchromatographie auf dem Träger erfolgt, der mit der Sensorschicht belegt wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzen der Probe durch spezifische oder unspezifische Adsorption an

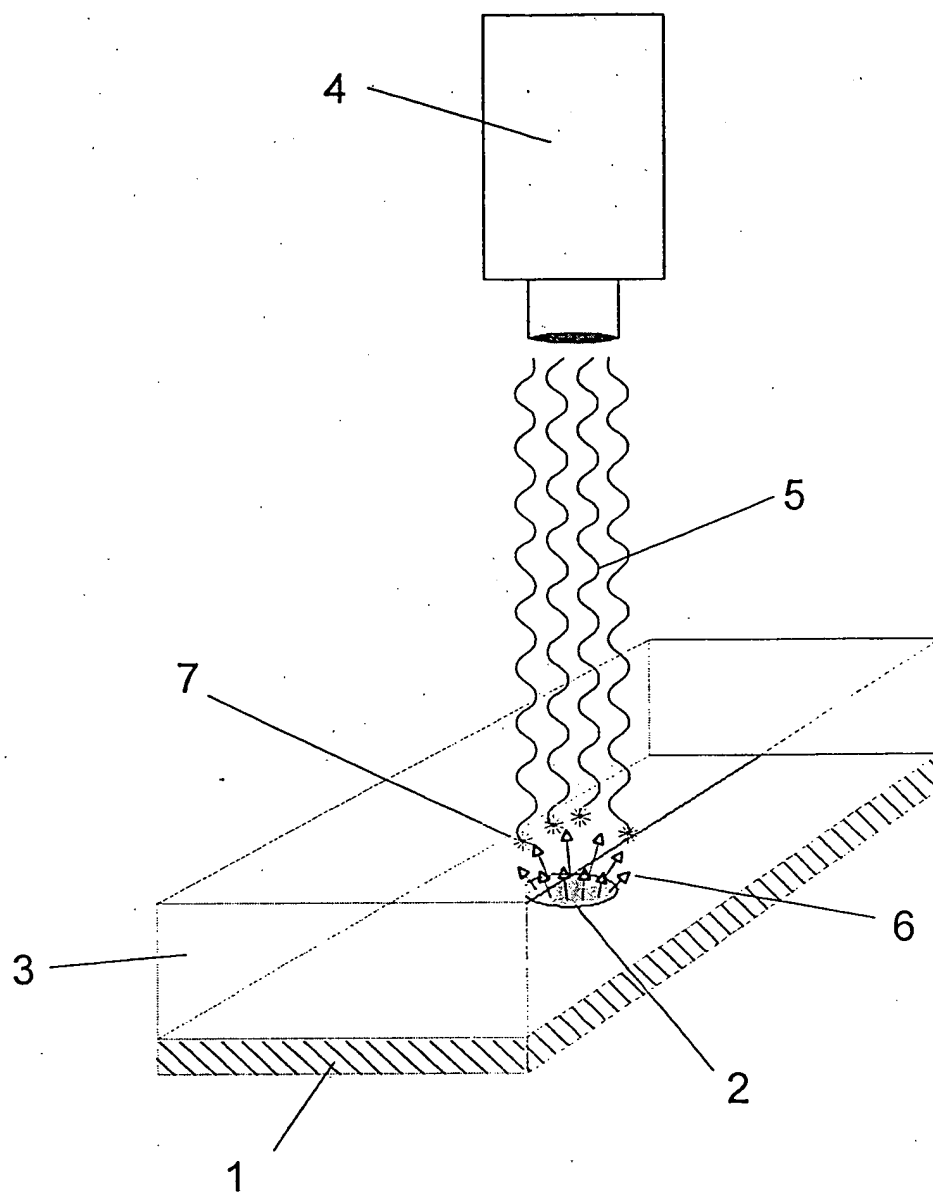
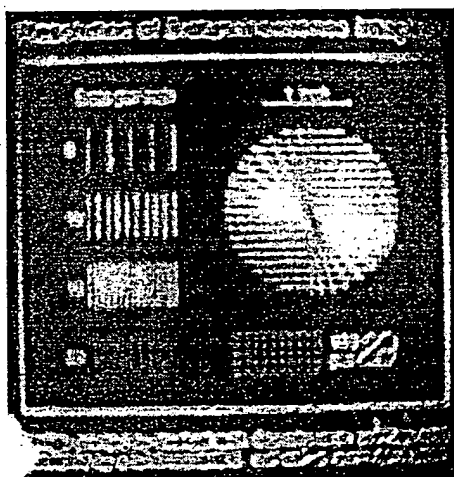
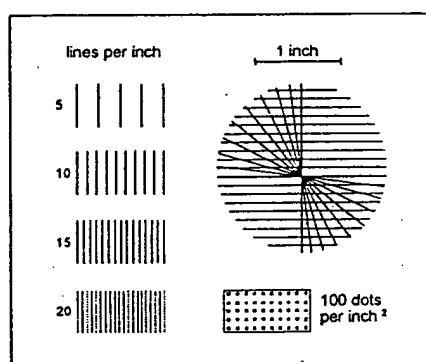


Fig. 1



Bioaktivitätsbild der Testgrafik

Resolution of Bioluminescence Imaging



Testgrafik

Fig. 2

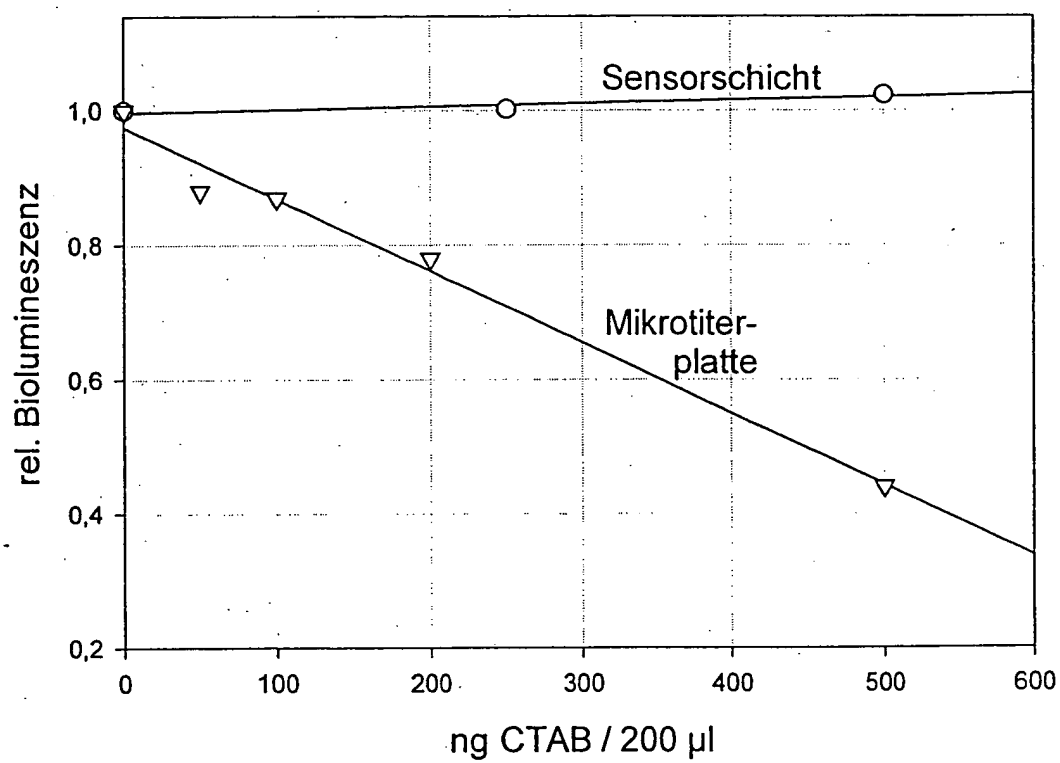


Fig. 3